

بررسی اثر داروی کلرپرومازین بر بیماری آنسفالومیلیت خود ایمن تجربی در موش های صحرایی نر

المیرا عابدی^۱، شیوا خضری^{۱*}، سید میثم ابطحی فروشانی^۲

گروه زیست شناسی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران؛ گروه میکروبیولوژی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۴/۹/۲۳

تاریخ پذیرش: ۹۵/۲/۱۴

چکیده:

زمینه و هدف: در تحقیقات اخیر به افزایش سطح دوپامین در مغز موش های مبتلا به آنسفالومیلیت خود ایمن تجربی (EAE) اشاره شده است. همچنین مشخص شده است که دوپامین می تواند عملکرد سلول های ایمنی را تنظیم کند. در این مطالعه اثرات درمانی کلرپرومازین به عنوان یک آنتاگونیست دوپامین بر روند EAE (مدل حیوانی بیماری ام اس) بررسی شد، همچنین پاسخ های لنفوسیت های T کمکی مورد ارزیابی قرار گرفت.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی، آنسفالومیلیت خود ایمن تجربی توسط نخاع هموژنیزه شده خوکچه هندی و ادجوانت کامل فروند در موش های صحرایی نر نژاد ویستار القاء شد. حیوانات در دو گروه ۷ سری قرار گرفتند. درمان با کلرپرومازین (۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم- روزانه و به صورت داخل صفاقی) از زمان بروز علائم ناتوانی در گروه درمانی (روز ۱۲) آغاز گشت. گروه کنترل تنها حلال دارو (آب مقطر) را با همان برنامه دریافت نمودند. علائم بالینی تا زمان کشتار موش ها یعنی روز ۳۶ روزانه ثبت گردید. میزان تکثیر به وسیله آزمون MTT و میزان تولید سیتوکین ها به وسیله ELISA در سلول های طحالی سنجیده شد.

یافته ها: تجویز کلرپرومازین پس از بروز علائم به طور معنی داری موجب تخفیف شدت علائم بالینی گشت. همچنین کلرپرومازین موجب کاهش معنی دار ($P<0/01$) تولید سیتوکین پیش التهابی IL-17 همزمان با افزایش سطح سیتوکین ضد التهابی IL-10 ($P<0/05$) در موش های صحرایی گروه درمان نسبت به گروه شاهد شد. از سوی دیگر، شدت تکثیر لنفوسیتی نیز در موش های صحرایی گروه تیمار نسبت به گروه شاهد کاهش معنی داری ($P<0/05$) یافت.

نتیجه گیری: نتایج این مطالعه نشان داد کلرپرومازین می تواند سیتوکین های التهابی را کاهش داده و بیماری ام اس را کنترل کند.

واژه های کلیدی: مولتیپل اسکلروزیس، آنسفالومیلیت تجربی خود ایمن، کلرپرومازین، پاسخ لنفوسیتی.

مقدمه:

روش های درمانی کم خطر و ارزان قیمت جهت افزودن به رژیم درمانی مبتلایان به ام اس لازم به نظر می رسد (۲،۱).

یک بیماری قابل القاء و خود التهابی سیستم اعصاب مرکزی در جانوران آنسفالومیلیت خود ایمن تجربی (Experimental Autoimmune Encephalomyelitis= EAE)

با وجود پیشرفت های که در سال های اخیر در درمان بیماری اسکروز متعدد (Multiple Sclerosis= MS) حاصل شده است، بسیاری از بیماران به داروهای یاد شده پاسخ نمی دهند، به طوری که مقوله درمان و جلوگیری از پیشرفت بیماری همچنان به عنوان یک چالش پیش روی مطرح می باشد. بنابراین دستیابی به

می باشد که سال ها است به عنوان مدل تجربی بیماری ام اس بلاخص به منظور ارزیابی داروهای جدید مورد استفاده قرار می گیرد (۴،۳). هر دو بیماری MS و EAE دارای یک ماهیت خود التهابی می باشند (۵،۶). شیوع ام اس در زنان ۲ تا ۳ برابر مردان می باشد و اغلب در سنین ۲۰ تا ۴۰ سالگی بروز می کند (۷). مهم ترین علائم این بیماری فلج حرکتی، تخریب حسی به ویژه اختلالات بینایی، نقایص شناختی و غیره می باشد (۸). حمله لنفوسیت های T کمکی ($CD4^+$) به بافت عصبی نقش مهمی در پاتوژنز این بیماری بازی می نماید. مطالعات قبلی مشخص کرده است که پروفایل سیتوکینی تولید شده توسط لنفوسیت T کمکی نقش اساس در وسعت و نوع ضایعات پاتولوژیک بیماری بازی می نماید (۹).

کلروپرومازین اولین داروی آنتی سایکوتیک و یکی از اعضای خانواده فنوتیازین ها است و در کاهش نشانه ها و عوارض بیماری جنون استفاده می شود (۱۰). در برخی از مطالعات گذشته به اثرات ایمونومودلاتوری و ضد التهابی کلروپرومازین پرداخته شده است. به نظر می رسد کلروپرومازین مهارکننده (Tumor Necrosis Factor= TNF) آلفا به دنبال سمیت ناشی از LPS در سلول های مونوسیت باشد (۱۱،۱۲). کارآیی داروهای آنتی سایکوتیک از قبیل کلروپرومازین در توانایی بلوک رسپتورهای دوپامین است (۱۳). کلروپرومازین یک آنتاگونیست بسیار موثر گیرنده های D2 دوپامینی و رسپتورهای مشابه مثل D3 و D5 است. برخلاف سایر اعضای این گروه، این دارو، انتخابیت بالایی نیز برای رسپتورهای D1 دارد. به طور جالب توجهی افزایش سطح دوپامین در مغز موش های مبتلا به EAE مشخص شده است (۱۴).

امروزه تا حدودی برخی از جنبه های ارتباط متقابل سیستم نورواندوکرین و سیستم ایمنی شناخته شده است. در همین زمینه مشخص شده است که فرایندهای مختلف فیزیولوژیک و یا پاتولوژیک در سیستم عصبی، در تنظیم پاسخ های ایمنی موثر

است (۱۵). از طرف دیگر مطالعات متعددی نشان داده است که دوپامین از طریق گیرنده های پاسخگو به دوپامین که در سطح بسیاری از سلول های ایمنی از قبیل سلول های دندرتیک، لنفوسیت های B و لنفوسیت های T، سلول های کشنده طبیعی، نوتروفیل ها، ائوزینوفیل ها و مونوسیت ها حضور دارند، موجب تعدیل پاسخ های ایمنی می شوند (۱۶). به دلیل حضور انواع مختلف گیرنده های پاسخگو به دوپامین بر سطح سلول های ایمنی برخی منابع بر دخالت دوپامین و گیرنده های آن در ایجاد خود ایمنی و سرطان اشاره نموده اند (۱۷). نشان داده شده است که برخی از سلول های ایمنی به طور جالب توجهی قادر به تولید و ذخیره سازی دوپامین در وزیکول های ترشحی خود می باشند. این سلول ها به دنبال تحریک، دوپامین را در محل آزاد می کنند (۱۸).

با این وجود به نظر نمی رسد که تاکنون تحقیق جامعی بر روی اثرات احتمالی آنتاگونیست های دوپامینی در مبتلایان به ام اس و یا مدل تجربی آن در داخل و یا خارج کشور صورت گرفته باشد. برخلاف برخی دیگر از داروهای آنتاگونیست دوپامین از قبیل سولپراید که تنها بر گیرنده های دوپامینی D2 و D3 موثر هستند، کلروپرومازین بر طیف وسیع تری از گیرنده های دوپامینی موثر است. همان طور که ذکر شد، سلول های ایمنی طیف انواع گیرنده هالی دوپامینی را بروز می دهند (۱۷). با توجه به مطالب فوق در این مطالعه بر آن شدیم، ضمن بررسی اثرات احتمالی کلروپرومازین بر روند بیماری EAE، اثرات آن را بر پلاریزه شدن پاسخ لنفوسیت های طحالی نیز ارزیابی کنیم.

روش بررسی:

در این مطالعه تجربی، موش های صحرایی نر خالص نژاد ویستار با محدوده سنی ۶ تا ۸ هفته و وزن تقریبی ۱۱۰ گرم استفاده شد و موش ها از مرکز پرورش حیوانات دانشکده علوم گروه زیست شناسی دانشگاه

ارومیه تهیه گردید. این پژوهش ها در حیوان خانه دانشکده علوم دانشگاه ارومیه در شرایط استاندارد آب، غذا، دما و نور کافی نگهداری شدند. کلیه مراحل این تحقیق در کمیته اخلاق پژوهشی دانشگاه ارومیه مورد تأیید قرار گرفته است.

روش القا EAE: برای این منظور هموژن بافت نخاع خوکیه هندی به نسبت ۱ به ۱ با ادجوانت کامل فروند (Compound Freund's Adjuvant= CFA) که محتوی ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم پیکره کشته شده مایکوباکتریوم بود، به حالت امولسیون در آمد. جهت تهیه سوسپانسیون مزبور از دو سرنگ شیشه‌ای که توسط رابطی از جنس استیل به هم متصل هستند، استفاده گردید. در یکی از سرنگ‌ها محلول بافت مغز و نخاع هموژن شده خوکیه و سرنگ دیگر محتوی هم حجم آن CFA وارد شده و عمل پر و خالی کردن سرنگ‌ها به نوبت تا حصول امولسیون سفید رنگ، یکنواخت و با قوام ادامه یافت. پس از بیهوشی موش های صحرایی (کتامین ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم و زایلازین ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم- شرکت Alfasan، هلند)، ۴۰۰ میکرولیتر مخلوط آنتی ژن و ادجوانت مزبور به صورت زیر جلدی در ناحیه پشت و ۱۰۰ میکرولیتر در ناحیه بالشتک هر حیوان با سوزن گیج ۲۵ تزریق گردید. مقدار 10^9 باکتری بروتدلا پاراپرتوسیس (مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران، IBRC-M 10710) نیز در حجم ۳۰۰ میکرولیتر PBS در روز ایمن سازی و ۴۸ ساعت بعد به صورت داخل صفاقی تزریق گردید. روند بیماری (شدت ناتوانی حرکتی) در هر کدام از موش های موجود در گروه ها، به صورت روزانه مورد ارزیابی قرار گرفت. از مقیاس زیر جهت ارزیابی شدت بیماری استفاده گردید: صفر: عدم بروز بیماری، یک: اختلال در حرکت دم، دو: فلج شدن دم، سه: فلجی دو پا، چهار: فلجی چهار دست و پا، پنج: مرگ (۱۹).

درمان رت های مبتلا به EAE با کلرپرومازین:

۱۴ سر موش صحرایی ویستار پس از نشان دادن بیماری به دو گروه ۷ سری با شرایط سنی و وزنی یکسان

تقسیم شده، تا ۲۴ روز پس از بروز علائم درمانگاهی به شرح زیر تحت درمان قرار گرفتند.

گروه تحت درمان: به منظور ارزیابی اثرات درمانی دارو، بر روی بیماری در حال جریان، پس از بروز اولین علائم درمانگاهی (روز ۱۲ پس از القای بیماری) اقدام به تجویز روزانه داروی کلرپرومازین (شرکت داروسازی تهران شیمی) به میزان ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم به رت های گروه مطالعه به صورت داخل صفاقی گردید.

گروه شاهد: شامل رت های مبتلا به EAE بودند که در حجم مشابه با گروه قبلی پس از بروز اولین علائم در تمام رت های گروه (روز ۱۲ پس از القا) تحت درمان با دارونما (آب مقطر) با حجم ۲۰۰ میکرولیتر قرار گرفتند.

تهیه کشت سلولی طحال و سنجش سیتوکین های موجود در مایع آن: ۲۴ روز پس از القای بیماری اقدام به نخاعی کردن رت ها شد. بدین ترتیب که طحال رت ها تحت شرایط استریل خارج و بعد از قطعه قطعه شدن در ۵ میلی لیتر محیط کشت RPMI-1640 (شرکت Sigma- آمریکا) حاوی ۱۰٪ (Fetal Bovine Serum= FBS) (شرکت Gibco- آلمان) له گردید. بافت حاصل جهت تهیه سوسپانسیون سلولی از توری سیمی به قطر ۲٪ میلی متر عبور داده شد. پس از سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه در ۲۰۰ گرم، به منظور حذف RBC ها، بر روی رسوب سلولی به دست آمده ۵ میلی لیتر بافر لیز کننده (کلرید آمونیوم: ۰/۱۵ مول، بی کربنات پتاسیم: ۱۰ میلی مول) به مدت ۱۰ دقیقه در ۲۰۰ گرم سانتریفیوژ شد (۲۰). سپس رسوب سلولی در محیط کشت RPMI حاوی ۱۰٪ FBS به حالت سوسپانسیون درآورده شد. پس از شمارش، سوسپانسیون سلولی به تعداد 2×10^6 سلول بر میلی لیتر از آن تهیه شد. این سلول ها در پلیت های کشت ۲۴ خانه در حضور فیتو هم آگلوتین به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور حاوی ۵٪ CO_2 با رطوبت ۸۰٪ کشت داده شدند. پس از طی این مدت مایع رویی آن ها جمع آوری شد (۲۱).

داده ها با آزمون کولوموگراف- اسمیرنوف تأیید و سپس از آزمون Student's t-test استفاده شد. در تمامی بررسی ها $P < 0.05$ به عنوان سطح معنی دار در نظر گرفته شد. کلیه ی داده ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار گزارش گردید. کلیه بررسی های آماری در محیط نرم افزاری SPSS (version 20, SPSS Inc., Chicago, IL) انجام شد و برای ترسیم نمودارها از نرم افزار Microsoft Excel ویراست ۲۰۱۳ استفاده شد.

یافته‌ها:

به دنبال فرآیند القای بیماری، موش ها به صورت روزانه تحت نظر قرار گرفتند. از روز دوازدهم پس از ایمن سازی علائم بالینی (شل شدگی دم) در برخی از موش های ایمن شده با عصاره بافت های عصبی و اجوات فروند ظاهر گردید، به طوری که ۲ روز بعد اکثر قریب به اتفاق (تقریباً همه موش ها) لااقل علائم شلی دم را نشان دادند.

مقایسه تغییرات روزانه ی علائم درمانگاهی بین دو گروه نشان دهنده ی تفاوت معنی دار در شدت علائم بالینی (اختلال حرکتی) در بازه ی زمانی روزهای ۱۵ تا ۳۶ پس از القای بیماری بود. به طوری که علائم در گروهی که کلرپرومازین دریافت کرده بودند کاهش یافت ($P < 0.05$).

بر اساس نتایج به دست آمده میانگین شدت ناتوانی نورولوژیک در طول دوره درمان در موش های تحت درمان با کلرپرومازین ($1/8 \pm 0/16$) نسبت به گروه شاهد ($2/16 \pm 0/12$) کمتر می باشد ($P < 0/001$) که به طور معنی داری کاهش یافته است. حداکثر میانگین شدت بیماری در روز ۱۷ پس از ایمن سازی مشاهده شد (نمودار شماره ۱).

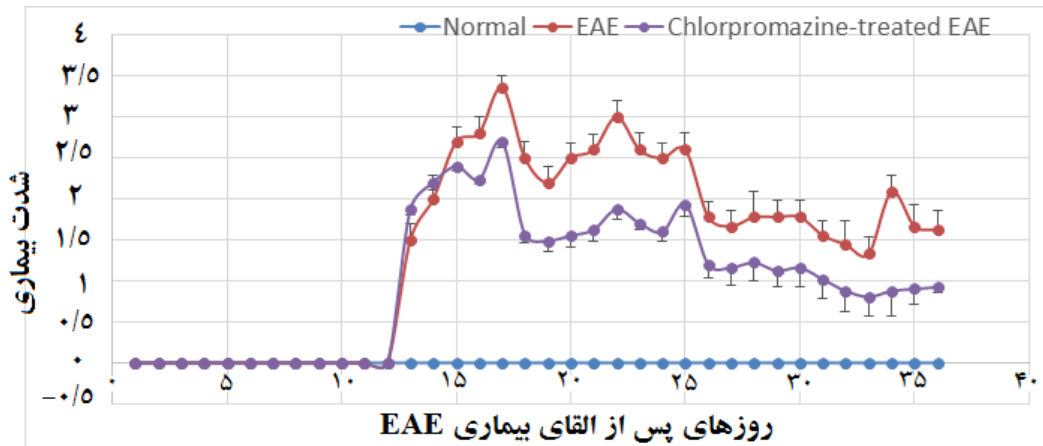
برای سنجش سیتوکین های $IL-10$ ، $IFN-\gamma$ از کیت های ELISA مربوطه (شرکت BENDERMED- آلمان) استفاده شد و بر طبق دستورالعمل مندرج در دفترچه ی راهنمای هر کدام از کیت ها اقدام گردید.

میزان تکثیر سلول های ایمنی با روش MTT بررسی شد. برای این کار پس از طراحی که در بالا توضیح داده شد، به دنبال شمارش سلول ها، سوسپانسیونی حاوی 1×10^6 سلول در میلی لیتر تهیه شد و ۱۰۰ میکرولیتر از آن در هر یک از چاهک های پلیت ۹۶ خانه ای ته تخت ریخته شد. برای هر نمونه سه تکرار بدون حضور پادگن و در حضور فیتو هم آگلوتنین در نظر گرفته شد. به عنوان بلانک نیز در سه چاهک از محیط RPMI خالی استفاده شد. بعد از ۷۲ ساعت نگهداری در انکوباتور حاوی ۵٪ CO_2 ، به هر چاهک ۲۵ میکرولیتر محلول MTT (۵ میلی گرم در میلی لیتر در PBS) افزوده شد و به مدت ۴ ساعت دیگر نگهداری گردید. در این مدت احیای ماده ی MTT توسط سلول های زنده و در حال تکثیر سبب تشکیل کریستال های فورمازون گردید که با افزودن ۱۰۰ میکرولیتر DMSO به حالت محلول درآمد. سپس شدت رنگ در طول موج ۴۹۰ نانومتر تعیین و ایندکس تحریک بر اساس رابطه ی زیر محاسبه گردید:

$$\text{بلانک OD} - \text{در حضور ODPHA} = \text{بلانک OD} - \text{در عدم حضور ODPHA} = \text{اندکس تحریک}$$

در رابطه فوق OD نشانگر جذب نوری و PHA نشانگر فیتو هم آگلوتنین است. به عنوان بلانک نیز در از محیط RPMI خالی استفاده شده است.

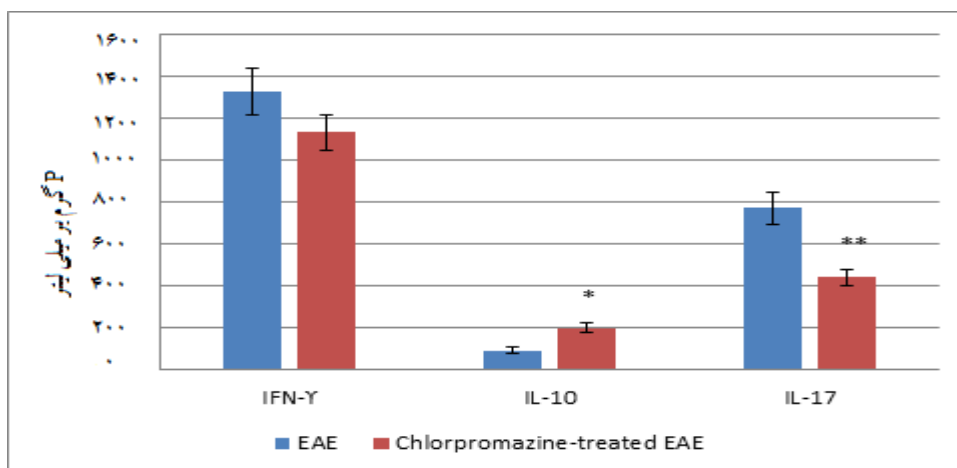
مقایسه داده های غیر پارامتری مرتبط با شدت علائم درمانگاهی با استفاده از آزمون Mann Whitney-U انجام شد. جهت مقایسه سایر داده ها ابتدا نرمال بودن



نمودار شماره ۱: مقایسه ی شدت بیماری در روزهای مختلف پس از القای بیماری EAE بین گروه های شاهد (EAE) و درمان شده با کلرپرومازین

هدف از انجام آزمایشات بعدی یافتن ساز و کارهای افزایش اثر بخشی کلرپرومازین بود. نتایج به دست آمده نشان داد که به دنبال تحریک لنفوسیت های طحالی، در گروه درمان شده با کلرپرومازین نسبت به موش های مبتلا و درمان نشده (شاهد) میزان تولید سیتوکین های پیش التهابی IL-17 کاهش معنی داری یافت ($P < 0.01$) (نمودار شماره ۲). به طور همزمان سطح سیتوکین ضد التهابی IL-10 در گروه درمان شده با کلرپرومازین نسبت به موش های مبتلا و درمان نشده افزایش معنی داری را نشان داد ($P < 0.05$) (نمودار شماره ۲). با وجودی که سطح سیتوکین پیش التهابی IFN- γ در گروه درمانی نسبت به گروه شاهد کاهش می یابد، اما این کاهش معنی دار نمی باشد (نمودار شماره ۲).

هدف از انجام آزمایشات بعدی یافتن ساز و کارهای افزایش اثر بخشی کلرپرومازین بود. نتایج به دست آمده نشان داد که به دنبال تحریک لنفوسیت های طحالی، در گروه درمان شده با کلرپرومازین نسبت به موش های مبتلا و درمان نشده (شاهد) میزان تولید سیتوکین های پیش التهابی IL-17 کاهش معنی داری یافت ($P < 0.01$) (نمودار شماره ۲). به طور همزمان



نمودار شماره ۲: مقایسه میانگین غلظت سیتوکین های IFN- γ ، IL-17 و IL-10 در سوپ رویی کشت سلول های

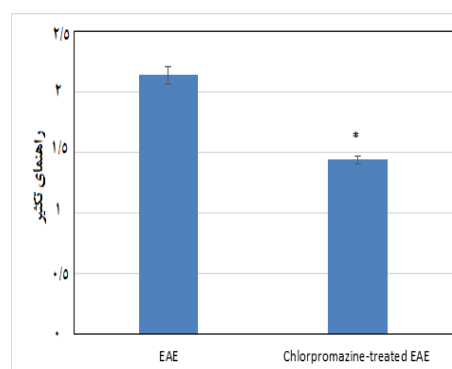
طحالی پس از ۷۲ ساعت کشت در حضور میتوژن فیتو هم آگلوتنین می باشد

* و ** به ترتیب نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح $P < 0.05$ و $P < 0.01$ نسبت به رت های گروه شاهد می باشد.

می باشند (۲۳). سلول های دندرتیک دارای کلیه آنزیم های لازم جهت ساخت دوپامین هستند. دوپامین تولید شده توسط این سلول ها آزاد شده و با تأثیر اتوکرین از طریق گیرنده های دوپامینی DAR5 اثر می کند. در پاسخ به این سلول های دندرتیک اقدام به تولید IL-23 می کنند. این اینترلوکین از جمله عوامل پیشبرنده در تکامل سلول های Th17 می باشد (۲۴).

IL-17 سیتوکن اصلی و شاخص رده سلولی Th17 می باشد. این سیتوکن یک سیتوکن پیش التهابی قوی بوده که بر روی طیف گسترده ای از سلول ها اثر کرده و موجب آزاد سازی انواع مدیاتورهای التهابی از قبیل سیتوکن های IL-6، IL-8، GN-CSF و G-CSF، کموکاین های CXCL1 و CXCL10 و متالوپروتئینازها می گردد (۵). سلول های مولد اینترلوکین ۱۷ قبل از یاخته های Th1 (لنفوسیت های مولد IFN- γ) به بافت مهاجرت کرده و با ایجاد شرایط التهابی و شکست سد خونی مغزی زمینه ورود سایر سلول های ایمنی از جمله سلول های Th1 را فراهم می دارند (۲۵). پس از ورود سلول های Th1 این سلول ها از طریق القای گونه های فعال اکسیژن و نیتریک اکسید در سلول های میکروگلیال در ایجاد EAE دخالت می کنند (۲۶). در مجموع به نظر می رسد که سلول های Th1 نیازمند مشارکت Th17 به منظور ایجاد حداکثری التهاب و تخریب بافتی باشند (۲۷). به علاوه، تعیین ویژگی های فنوتیپی کلون های Th17 بروز سطح بالاتری از شاخص های فعال سازی، مولکول های چسبان را نسبت کلون های سلول های Th1 نشان داده است (۴). بنابراین به نظر می رسد که سلول های Th17 در قیاس با Th1 نقش مهم تری را در ایجاد بیماری بازی می نمایند. عملکرد اصلی IL-17 در ایمونوپاتوژنز EAE شکستن سد خونی - مغزی می باشد (۱۸). گزارش شده است که بین سطح IL-17 و تعداد پلاک های فعال در افراد مبتلا به MS ارتباط وجود دارد (۲۸). تجویز پادتن های تک دودمانی خنثی کننده IL-17 در موش های ایمن شده با پادگن میلینی مانع بروز کموکاین ها در مغز شده و

میزان تکثیر لنفوسیت های طحالی به شیوه MTT سنجیده شد و تحت عنوان شاخص تحریکی گزارش گردید. نتایج حاصل از تست لنفوسیتی حاکی از کاهش معنی داری در سطح ($P < 0.05$) شدت تکثیر لنفوسیتی در گروه های دریافت کننده درمان نسبت به گروه شاهد به دنبال تحریک لنفوسیتی های طحالی با میتوزن فیتو هم آگلوتنین در محیط کشت می باشد (نمودار شماره ۳).



نمودار شماره ۳: مقایسه ی تکثیر لنفوسیت های طحالی در تحریک با میتوزن فیتو هم آگلوتنین

*: نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح $P < 0.05$ نسبت به رت های گروه شاهد می باشد. در روز ۳۶ پس از ایمن سازی سلول های طحالی جدا شده و به مدت ۷۲ ساعت تحریک شدند. این میزان تکثیر لنفوسیت های طحالی به شیوه MTT سنجیده شد و تحت عنوان شاخص تحریکی گزارش گردید.

بحث:

بر اساس مطالعات گذشته مشخص شده است که در آغاز و همچنین اوج علائم EAE میزان دوپامین در هسته های مخطط مغز به نحو قابل توجهی افزایش می یابد. این افزایش سطح دوپامین همزمان با افزایش mRNA اینترلوکین ۱ و TNF- α در هسته های مخطط مغز می باشد (۲۲). سلول های دندرتیک از جمله اساسی ترین سلول های آغاز کننده واکنش های ایمنی

متعاقب آن از بروز بیماری جلوگیری می‌شود (۲۹). همچنین موش‌های دچار نقصان در IL-17، بیماری EAE را با تأخیر نسبت به موش‌های سالم شروع کرده و در مقایسه با آن‌ها، بیماری به مراتب ملایم‌تری را نشان می‌دهند (۳۰).

بر اساس یافته‌های ما درمان با کلروپرومازین در مدل موشی بیماری MS، موجب کاهش سطح IL-17 بدون تغییر معنی‌دار در سطح اینترفرون گاما می‌گردد. با توجه به اهمیت بیشتر IL-17 می‌توان به دلیل کاهش شدت بیماری در گروه درمانی علی‌رغم عدم تغییر در سطح IFN- γ پی برد. به نحو جالب توجهی نشان داده شده است که سطح بالای IL-17 در خون افراد مبتلا به MS در ارتباط با عدم پاسخ نسبت به INF- β بوده است (۳۰). به علاوه نشان داده شده است که گیرنده‌های دوپامینی موجود در سطح تنظیمی با ارسال پیام‌های مهارتی مانع عملکرد مناسب لنفوسیت‌های T کمکی تنظیمی می‌شوند (۳۲). وظیفه اصلی لنفوسیت‌های T کمکی تنظیمی، محدود کردن و تنظیم واکنش‌های ایمنی است (۳۳). بنابراین به نحو جالب توجهی درمان با INF- β در افراد مبتلا به MS موجب کاهش بیان گیرنده‌های دوپامینی در سطح این سلول‌ها می‌شود. (۳۲). بر اساس یافته‌های ما درمان با کلروپرومازین در مدل جانوری بیماری MS موجب کاهش سطح IL-17 را فراهم می‌دارد. بنابراین این احتمال مطرح می‌گردد که افزودن این دارو به رژیم درمانی این افراد دارای اثرات سودمندی باشد.

IL-10، نقش مهمی را در محدود کردن پاسخ‌های التهابی و ممانعت از ایجاد آسیب‌های بافتی، بازی می‌نماید، این سیتوکین در ابتدا نیز به عنوان فاکتور مهارگر ساخت سیتوکین (CSIF)، شناخته شده است (۳۴). سیتوکین مزبور از طریق مهار فعالیت ماکروفاژها و سلول‌های میکروگلیال فعالیت‌های اصلی ضد التهابی خود را اعمال می‌نماید. در مبتلایان به اسکروز متعدد افزایش سطح این سیتوکین در مرحله فروکشی بیماری و متقابلاً کاهش سطح آن در مرحله

عود بیماری گزارش شده است (۲۶). موش‌هایی که از نظر ژنتیکی دچار نقصان در IL-10 بوده‌اند، بیماری EAE شدیدتری را نشان داده‌اند، در حالی که موش‌های حاوی ژن انتقالی IL-10 بیماری را با شدت کمتری نشان داده‌اند (۳۵). تا مدتی قبل IL-10 به عنوان یک سیتوکین Th2 پذیرفته شده بود ولی هم‌اکنون مشخص شده است که طیف گسترده‌ای از سلول‌ها از قبیل سلول‌های Treg و حتی رده‌های Th1 و Th17 قادر به تولید آن هستند. از جمله منابع دیگر تولید IL-10 سلول‌های تنظیمی نوع ۱ (Tr1) می‌باشد (۳۶). بر اساس نتایج ما به نظر می‌رسد که درمان با کلروپرومازین در افزایش سطح این سیتوکین نسبت به سایر ترکیبات موثرتر بوده است.

گسترش لنفوسیت‌های خود واکنشگر در بافت‌های محیطی و نفوذ آن‌ها به دستگاه عصبی مرکزی عامل شعله‌ور سازی بیماری می‌باشد (۳۴). کاهش تکثیر لنفوسیتی در پاسخ به تحریک مجدد با میتوزن فیتوهم آگلوتین و به تبع آن کاهش لنفوسیت‌های خود واکنشگر که در گروه‌های درمانی با کلروپرومازین دیده شده، از جمله عوامل کاهنده شدت بیماری می‌باشد. در همین راستا گزارشات متعددی موجود است که مصرف بیش از حد کلروپرومازین از طریق کاهش تعداد سلول‌های سفید خونی و حتی در موارد حاد، آگرانولوسیتوز منجر به مرگ بر اثر عفونت‌های غیر قابل کنترل می‌شود (۳۷). با توجه به اثرات ضد تکثیری IL-10 و افزایش سطح آن در رت‌های گروه درمانی، ممکن است تا حدودی کاهش تکثیر لنفوسیتی را در گروه درمانی توجیه نمود (۳۸).

همان‌طور که در قسمت مقدمه ذکر شد، به نظر نمی‌رسد که تاکنون تحقیق جامعی در مورد اثر کلروپرومازین بر روند ام‌اس یا EAE صورت گرفته باشد. تنها اطلاعات موجود حاکی از آن است که تحریک گیرنده دوپامینی DR5 در سطح سلول‌های دندریتیک منجر به تشدید پاسخ‌های Th17 در موش‌های مبتلا به EAE می‌شود (۳۹).

نتیجه گیری:

در مجموع می توان این طور نتیجه گیری کرد که درمان با کلرپرومازین به عنوان یک آنتاگونیست دوپامینی پس از بروز علائم درمانگاهی موجب بهبود در نمای بالینی بیماری EAE نسبت به گروه رت های مبتلا و بدون درمان شده است. لازم به ذکر است که درمان بیماری های خود ایمن به طور معمول پس از بروز علائم درمانگاهی یعنی در زمانی که کلون های لنفوسیت های خود واکنشگر به طور گسترده ای تکثیر یافته و تبدیل به سلول های تمایز یافته دارای عملکرد شده اند، صورت می گیرد. در این مطالعه نیز پس از شروع اولین

علائم درمانگاهی درمان آغاز شد. با همه این تفاسیر، این مطالعه یک مطالعه مقدماتی بوده و لازم است در آینده مطالعات بیشتری صورت گیرد.

تشکر و قدردانی:

این مقاله حاصل پایانامه ی کارشناسی ارشد فیزیولوژی جانوری دانشگاه ارومیه با کد ۲۰۲۱ می باشد که در تاریخ ۹۳/۱۲/۰۵ به تصویب رسیده است. بدینوسیله از کارکنان آزمایشگاه فیزیولوژی گروه زیست شناسی و آزمایشگاه ایمنی شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه تشکر می نمایم.

منابع:

1. Goldenberg MM. Multiple sclerosis review. Pharm Therap. 2012; 37(3): 175-84.
2. Vosoughi R, Freedman MS. Therapy of MS. Clin Neurol Neurosurg. 2010; 112(5): 365-85.
3. Gold R, Linington C, Lassmann H. Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. Brain. 2006; 129(8): 1953-71.
4. Comabella M, Khoury SJ. Immunopathogenesis of multiple sclerosis. Clin Immunol. 2012; 142(1): 2-8.
5. Kuerten S, Lehmann PV. The immune pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis: lessons learned for multiple sclerosis? J Interferon Cytokine Res. 2011; 31(12): 907-16.
6. Rolak LA. Multiple sclerosis: it's not the disease you thought it was. Clin Med Res. 2003; 1(1): 57-60.
7. McQualter JL, Bernard CC. Multiple sclerosis: a battle between destruction and repair. J Neurochem. 2007; 100(2): 295-306.
8. Pahan K. Neuroimmune pharmacological control of EAE. J Neuroimmune Pharmacol. 2010; 5(2): 165-7.
9. Lees JR, Iwakura Y, Russell JH. Host T cells are the main producers of IL-17 within the central nervous system during initiation of experimental autoimmune encephalomyelitis induced by adoptive transfer of Th1 cell lines. J Immunol. 2008; 180(12): 8066-72.
10. Orellana JA, Palacios-Prado N, Saez JC. Chlorpromazine reduces the intercellular communication via gap junctions in mammalian cells. Toxicol Appl Pharmacol. 2006; 213(3): 187-97.
11. Zinetti M, Galli G, Demitri MT, Fantuzzi G, Minto M, Ghezzi P, et al. Chlorpromazine inhibits tumour necrosis factor synthesis and cytotoxicity in vitro. Immunology. 1995; 86(3): 416-21.
12. Bertini R, Garattini S, Delgado R, Ghezzi P. Pharmacological activities of chlorpromazine involved in the inhibition of tumour necrosis factor production in vivo in mice. Immunology. 1993; 79(2): 217-9.

13. Kapur S, Mamo D. Half a century of antipsychotics and still a central role for dopamine D2 receptors. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2003; 27(7): 1081-90.
14. Pacheco R, Contreras F, Zouali M. The dopaminergic system in autoimmune diseases. *Front Immunol*. 2014; 5: 117.
15. Blalock JE. The syntax of immune-neuroendocrine communication. *Immunol Today*. 1994; 15(11): 504-11.
16. Pacheco R, Prado CE, Barrientos MJ, Bernales S. Role of dopamine in the physiology of T-cells and dendritic cells. *J Neuroimmunol*. 2009; 216(1-2): 8-19.
17. Pacheco R, Riquelme E, Kalergis AM. Emerging evidence for the role of neurotransmitters in the modulation of T cell responses to cognate ligands. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem*. 2010; 10(1): 65-83.
18. Prado C, Bernales S, Pacheco R. Modulation of T-cell mediated immunity by dopamine receptor d5. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2013; 13(2): 184-94.
19. Abtahi Froushani SM, Delirez N, Hobbenaghi R, Mosayebi G. Synergistic effects of atorvastatin and all-trans retinoic acid in ameliorating animal model of multiple sclerosis. *Immunol Invest*. 2014; 43(1): 54-68.
20. Obuchowicz E, Turchan J. Effects of acute or long-term treatment with chlorpromazine, haloperidol or sulpiride on neuropeptide Y-like immunoreactivity concentrations in the nucleus accumbens of rat. *Eur Neuropsychopharmacol*. 1999; 9(1-2): 51-9.
21. Abtahi Froushani SM, Esmaili Gourvarchin Galeh H. New insight into the immunomodulatory mechanisms of Tretinoin in NMRI mice. *Iran J Basic Med Sci* 2014; 17: 632-7.
22. Balkowiec-Iskra E, Kurkowska-Jastrzebska I, Joniec I, Ciesielska A, Czlonkowska A, Czlonkowski A. Dopamine, serotonin and noradrenaline changes in the striatum of C57BL mice following myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) 35-55 and complete Freund adjuvant (CFA) administration. *Acta Neurobiol Exp*. 2007; 67(4): 379-88.
23. Auletta JJ, Devine SM, Waller EK. Plasmacytoid dendritic cells in allogeneic hematopoietic cell transplantation: benefit or burden? *Bone Marrow Transplant*. 2016; 51(3): 333-43.
24. Prado C, Contreras F, Gonzalez H, Diaz P, Elgueta D, Barrientos M, et al. Stimulation of dopamine receptor D5 expressed on dendritic cells potentiates Th17-mediated immunity. *J Immunol*. 2012; 188(7): 3062-70.
25. Jadidi-Niaragh F, Mirshafiey A. Th17 cell, the new player of neuroinflammatory process in multiple sclerosis. *Scand J Immunol*. 2011; 74(1): 1-13.
26. Petro TM. Regulatory role of resveratrol on Th17 in autoimmune disease. *Int Immunopharmacol*. 2011; 11(3): 310-8.
27. Murphy AC, Lalor SJ, Lynch MA, Mills KH. Infiltration of Th1 and Th17 cells and activation of microglia in the CNS during the course of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Behav Immun*. 2010; 24(4): 641-51.
28. Hedegaard CJ, Krakauer M, Bendtzen K, Lund H, Sellebjerg F, Nielsen CH. T helper cell type 1 (Th1), Th2 and Th17 responses to myelin basic protein and disease activity in multiple sclerosis. *Immunology*. 2008; 125(2): 161-9.
29. Hofstetter H, Gold R, Hartung HP. Th17 Cells in MS and Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Int MS J*. 2009; 16(1): 12-8.
30. Fletcher JM, Lalor SJ, Sweeney CM, Tubridy N, Mills KH. T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clin Exp Immunol*. 2010; 162(1): 1-11.
31. Balasa R. T helper 17 cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Rom J Neurol*. 2010; 9(4): 181-8.

32. Cosentino M, Zaffaroni M, Trojano M, Giorelli M, Pica C, Rasini E, et al. Dopaminergic modulation of CD4+CD25(high) regulatory T lymphocytes in multiple sclerosis patients during interferon-beta therapy. *Neuroimmunomodulation*. 2012; 19(5): 283-92.
33. Meng X, Yang J, Dong M, Zhang K, Tu E, Gao Q, et al. Regulatory T cells in cardiovascular diseases. *Nat Rev Cardiol*. 2016; 13(3): 167-79.
34. Aktunc E, Kayhan B, Arasli M, Gun BD, Barut F. The effect of atorvastatin and its role on systemic cytokine network in treatment of acute experimental colitis. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2011; 33(4): 667-75.
35. Lovett-Racke AE, Racke MK. Retinoic acid promotes the development of Th2-like human myelin basic protein-reactive T cells. *Cell Immunol*. 2002; 215(1): 54-60.
36. Saraiva M, O'Garra A. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat Rev Immunol*. 2010; 10(3): 170-81.
37. Mahmood T, Warren JP. Neuroleptic malignant syndrome from chlorpromazine: case report. *J Roy Coll Gen Pract*. 1989; 39 (322): 211.
38. Murdaca G, Colombo BM, Puppo F. The role of Th17 lymphocytes in the autoimmune and chronic inflammatory diseases. *Intern Emerg Med*. 2011; 6(6): 487-95.
39. Prado C, Contreras F, Gonzalez H, Diaz P, Elgueta D, Barrientos M, et al. Stimulation of dopamine receptor D5 expressed on dendritic cells potentiates Th17-mediated immunity. *J Immunol*. 2012; 188(7): 3062-70.

Evaluation of the chlorpromazine effect on experimental autoimmune encephalomyelitis in male rats

Abedi A¹, Khezri SH^{1*}, Abtahi Froushani SM²

¹Biology Dept., Urmia University, Urmia, I.R. Iran; ²Microbiology Dept., Urmia University, Urmia, I.R. Iran.

Received: 14/Dec/2015 Accepted: 3/May/2016

Background and aims: Recent studies address an increase in dopamine levels in the brain of the mice with experimental autoimmune encephalomyelitis. Moreover, it is revealed that dopamine could regulate the immunity function of cells. In the present study, the therapeutic effect of chlorpromazine, as a dopamine antagonist, has been investigated on experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), which is a MS animal model. Furthermore, its effects on T-helper cells responses has been evaluated.

Methods: In this experimental study, EAE was induced by guinea pig spinal cord homogenate and complete Freund's adjuvant in male Wistar rats. Animals were placed in two therapeutic groups (n=7) Treatment with chlorpromazine (10 mg/kg-daily and intraperitoneally) was initiated when the treatment group developed a disability score (day 12). The control group just received a drug solvent (distilled water) with the same schedule. Signs of disease were recorded daily until the day 36 when the rats were sacrificed. Splenocytes were tested for proliferation by MTT test and cytokine production by ELISA.

Results: Chlorpromazine administration reduced the clinical features of EAE significantly after the occurrence of clinical symptoms. Moreover, Chlorpromazine inhibited the production of pro-inflammatory IL-17 ($P<0.01$) significantly, and simultaneously increased the levels of anti-inflammatory IL-10 ($P<0.05$) in treatment group compared to the control EAE rats. On the other hand, Lymphocyte proliferation significantly decreased ($P<0.05$) in the treatment group compared to that of the control group.

Conclusion: The results of this study show that chlorpromazine can reduce the inflammatory cytokines and control MS disease.

Keywords: Multiple sclerosis, Experimental autoimmune encephalomyelitis, Chlorpromazine, Lymphocyte response.

Cite this article as: Abedi A, Khezri SH, Abtahi Froushani SM. Evaluation of the chlorpromazine effect on experimental autoimmune encephalomyelitis in male rats. J Shahrekord Univ Med Sci. 2017; 18(6): 91-101.

***Corresponding author:**

Biology Dept., Urmia University, Urmia, I.R. Iran. Tel: 00984431942122,
E-mail: sh.khezri@urmia.ac.ir